

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

**Über das Verhalten
der Substratgehalte der Glykolyse
und der Adenosinnukleotide
in der Rattenleber während chronischer
Thioacetamidvergiftung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lore Ranft, geb. Frickler
aus Kassel

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

**Über das Verhalten
der Substratgehalte der Glykolyse
und der Adenosinnukleotide
in der Rattenleber während chronischer
Thioacetamidvergiftung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lore Ranft, geb. Frickler
aus Kassel

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 28. November 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr.med.R.Siegert

Referent: Prof.Dr.rer.nat. P. Karlson

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Schmid

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen	II
Einleitung - Leberzirrhose in der Statistik	1
- Eigenschaften des Thioacetamids	2
- Leberschäden durch Thioacetamid	3
Fragestellung	6
Methodik - Tierversuche	7
- Gewebsentnahme	7
- Extrakterstellung	8
- Optischer Test	9
- Durchführung der Einzelbestimmungen	13
Ergebnisse - Zusammenfassung der gemessenen Substrate	17
- Vergleich der Metabolitgehalte in Lebern unbehandelter Kontrolltiere verschiedener Altersgruppen	18
- Metabolitgehalte in Lebern von Ratten während der Behandlung mit Thioacetamid:	
a) Makroskopische Befunde	21
b) Metabolitgehalte	22
c) Metabolitgehalte bei Ischämie	28
d) Verhalten des extrazellulären Raumes	30
Diskussion - Thioacetamidwirkungen. Vergleich histologischer Ergebnisse mit gemessenen Metabolitkonzentrationen	32
a) an Zellmembran und Mitochondrien	33
b) am Zellkern	36
c) am endoplasmatischen Retikulum	38
Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	45
Akademische Lehrer	46

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADP	- Adenosindiphosphat
AMP	- Adenosinmonophosphat
ATP	- Adosintriphosphat
DAP	- Dioxyacetonphosphat (=Dihydroxyacetonphosphat)
1,3-diPGS	- 1,3-diphosphoglycerinsäure
FDP	- Fruktose-1,6-diphosphat
F-6-P	- Fruktose-6-Phosphat
GAP	- Glycerinaldehydphosphat
α -GP	- L(-)- α -Glycerophosphat
G-6-P	- Glukose-6-Phosphat
HK	- Hexokinase
Laktat	- L(+)-Laktat
LDH	- Laktatdehydrogenase
Malat	- L(-)-Malat
LK	- Myokinase
NAD	- oxydiertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH ₂	- reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	- oxydiertes Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH ₂	- reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
PEP	- Phosphoenolpyruvat
P _o	- anorgan. Phosphat
6-P-Glukonat	- 6-Phosphoglukonat
2-PGS	- 2-Phosphoglycerinsäure
3-PGS	- 3-Phosphoglycerinsäure
PK	- Pyruvatkinase
SDH	- Succinodehydrogenase

Symbole:

d	- Schichtdicke
ΔE	- Extinktionsdifferenz
n	- Zahl der Versuche
nMol	- Nanomol = 1×10^{-9} Mol
p	- Signifikanz
s	- Standardabweichung
t	- Zeit

An den tödlich verlaufenden Erkrankungen haben die Leberkrankheiten einen nicht unbeachtlichen Anteil. Die Zahl der Leberzirrhosekranken ist dabei in ständiger Zunahme begriffen.¹⁶⁾²³⁾ Die vom Pathologischen Institut in Bonn ermittelte Prozentzahl betrug 4,3 bei 3924 durchgeführten Obduktionen.⁵⁾ Bei den an Leberzirrhose Erkrankten beträgt die Überlebensrate 1 Jahr nach klinischer Diagnosestellung 20 - 53 % und 5 Jahre nach Diagnosestellung nur noch 4 - 15%. (Zusammenstellung von Creutzfeldt und Mitarb.¹⁰⁾) Dabei steht das Leberkoma mit 50 - 79 % an erster Stelle der Todesursachen.¹⁰⁾⁴¹⁾ Eine kritische Betrachtung der bisherigen Therapieerfolge bei Leberzirrhose zeigt keine wesentliche Besserung dieses Krankheitsbildes und keine Verlängerung der Lebenserwartung.¹⁰⁾

Um einen pathologischen Zustand angehen zu können, ist es erforderlich, zunächst dessen Wesen: Pathogenese und Verlaufsformen zu kennen, sowie die Grundphänomene des pathologischen Stoffwechsels zu analysieren. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sind meist tierexperimentelle Untersuchungen erforderlich.

Zur Erzeugung einer tierexperimentellen Leberzirrhose, welche am ehesten geeignet wäre, als Modell der Zirrhose des Menschen zu dienen, ist die Anwendung einer Substanz erforderlich, welche in ihrer pharmakologischen Wirkung zu einem Wechselspiel zwischen Leberzellnekrosen, kompensatorischer Zellregeneration und reparatorischer

Mesenchymreaktion führt, da diese Vorgänge die Voraussetzung für einen zirrhrotischen Umbau der Leber darstellen. Auch wäre eine gleichmäßige, über einen längeren Zeitraum mögliche Applikationsform wünschenswert. Diese Voraussetzungen werden am besten von Thioacetamid ($\text{CH}_3\text{-CS-NH}_2$), welches mit dem Futter verabfolgt werden kann, erfüllt.

Die toxische Wirkung des Thioacetamids wurde im Jahr 1948 entdeckt.¹⁴⁾ Die Verbindung ist ein sehr wirksames Mittel gegen die Orangenfäule, da sie rasch in die Fruchtschale und in das Fruchtfleisch eindringt. Eine praktische Anwendung kam jedoch nicht in Betracht, da die pharmakologische Prüfung die oben geschilderten toxischen Wirkungen aufdeckte.

Thioacetamid hat chemisch die Formel $\text{CH}_3\text{-CS-NH}_2$. Es besitzt die Eigenschaft, thioacylierend zu wirken.³⁰⁾ Nygaard und Mitarbeiter³¹⁾ untersuchten das Schicksal des Thioacetamids im Organismus mit der Isotopentechnik (Markierung mit ^{35}S). Dabei wurden geringe Konzentrationsanreicherungen vorübergehend im Knochenmark, der Schilddrüse und dem Nebennierenmark gefunden. Es ist bemerkenswert, daß die Leber keine auffallende Einlagerung zeigte, obwohl sie durch Thioacetamid so stark geschädigt wird.

Der unmittelbare Angriffspunkt der Thioacylie und damit auch des Thioacetamids in den Stoffwechsel ist nicht

bekannt. Nygaard und Mitarbeiter ³¹⁾ fanden, daß es innerhalb von 24 Stunden zu 80 % im Urin ausgeschieden wird. Davon entfallen 25 % auf unverändertes Thioacetamid, der Rest wird als freies oder verestertes Sulfat eliminiert. Diese rasche Ausscheidung macht die Notwendigkeit einer ständigen Verabreichung zur Erzeugung einer chronischen Leberschädigung verständlich.

Neben einer steuerbaren Leberzirrhose lassen sich mit Thioacetamid noch weitere Leberveränderungen erzeugen, welche lediglich dosierungs- und zeitabhängig sind:

Eine einmalige Dosierung von 200 - 400 mg/kg Ratte p.o. führte zum Tode der Versuchstiere innerhalb von 72 Stunden. Es kam dabei zu Leberzellnekrosen, die vorwiegend das Läppchenzentrum befielen.¹⁴⁾¹⁷⁾

Eine Applikation von 0,016 - 0,032 % Thioacetamid in der Nahrung führt bei Ratten zu chronischen Umbauveränderungen in der Leber, die nach etwa 190 Tagen deutlich sind.²⁾¹⁸⁾⁴⁰⁾

Mit einer täglichen Fütterung von 20 ml einer 0,03 %igen Thioacetamidlösung erzeugten Thoenes und Mitarbeiter ⁴⁰⁾ nach 27 Wochen eindeutige Cholangiome, welche solche Entdifferenzierung aufwiesen, daß sie auf Grund des histologischen Bildes als Cholangiokarzinome angesehen werden mußten. Metastasen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. 35 Wochen nach Beginn der

Fütterungsversuche fanden die gleichen Autoren auch echte hepatozelluläre Karzinome.

Becker und Mitarbeiter ⁴⁾ konnten nach 80 tägiger Applikation von Thioacetamid-S-oxyd ($\text{CH}_2\text{-CSO-NH}_2$) bei einer Gesamtdosierung von 319 mg ein echtes Gallengangs-karzinom mit Lungenmetastasen im Tierversuch (Ratte n) nachweisen.

Die bisherigen Untersuchungen mit Thioacetamid haben zu verschiedenen Vorstellungen über dessen Wirkungsmechanismus im Zellstoffwechsel geführt. Der Klärung dieser Frage hat man sowohl biochemisch, histochemisch als auch mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen beizukommen versucht. Eine kritische Zusammenstellung bisheriger Ergebnisse hat Brodehl ⁷⁾ 1961 gegeben.

Bei histologischen Untersuchungen fanden die Autoren übereinstimmend eine zentrolobuläre Schädigung der Leber mit Kern- und Nukleolenvergrößerung, das sogenannte Nukleolusphänomen einerseits, Auflösung und Schwund des Ergastoplasmas und hochgradigen Glykogenschwund andererseits. Bezieht man die übrigen Ergebnisse über die Thioacetamidschädigung in die histologischen Veränderungen ein, so kann man sagen, daß verschiedene Effekte an drei verschiedenen Strukturen der Zelle nachgewiesen worden sind:

1. An der Zellmembran und den Mitochondrien
(Ca^{++} -Effekt)¹⁵⁾²²⁾⁴²⁾

2. Am Zellkern mit Beeinflussung der Proteinsynthese
1)3)4)18)24)25)33)35)36)37)
3. Am endoplasmatischen Retikulum. 40)

F R A G E S T E L L U N G

Die Tatsache, daß bei fast allen Leberschädigungen primär und vor Einsetzen der histologisch manifesten Veränderungen Glykogenschwund eintritt und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Thoenes und Bannasch,⁴⁰⁾ welche auf Grund von Veränderungen am glatten endoplasmatischen Retikulum durch Thioacetamideinwirkung eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels vermuten lassen, wurde Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Es sollen Zwischenstoffkonzentrationen der glykolytischen Kette und der Adenosinnukleotide - Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Adenosinmonophosphat - als Ausdruck des "Energiepotentials" im Verlauf eines chronischen Leberschadens bis zur Ausbildung einer Leberzirrhose, hervorgerufen durch chronische Thioacetamidvergiftung, bestimmt werden.

METHODIK

Tierversuch

Männliche Wistarratten mit einem Ausgangsgewicht von 120 - 150 g wurden während der Versuchsreihe, die sich über einen Zeitraum von 43 Wochen erstreckte, mit Laatz-Standardfutter* und einem 0,015 % Thioacetamid enthaltendem Leitungswasser ad libidum gefüttert. Dies entsprach bei einer Trinkmenge von etwa 6ml/Tag einer Thioacetamidaufnahme von etwa 1 mg/Tag. Die Kontrolltiere erhielten gleiches Futter und reines Leitungswasser.

Die Thioacetamidlösung wurde jeweils aus einer haltbaren Stammlösung, welche 10 g Substanz in 90 g Äthanol gelöst enthielt, durch Verdünnung mit Leitungswasser hergestellt. (10 ml 10 %ige Lösung auf 5 Liter Leitungswasser.)

Gewebsentnahme

Die Gewebsentnahme wurde in leichter Äthernarkose (ca 1 - 1 1/2 Minuten) mit der Frierzangentechnik 13)43) durchgeführt: Dabei wird das Lebergewebe zwischen zwei in flüssiger Luft vorgekühlten Metallblöcken in situ fixiert und danach aus dem Gewebsverband abgetrennt. Nach Gewebsentnahme wurden die Versuchstiere durch Dekapitation getötet. Diese

* Firma Laatz, Euskirchen

Technik der Gewebsentnahme garantiert die geringste Alteration des Gewebes.

Die Untersuchungen wurden zwischen 10. bis 21.

Fütterungstag täglich, zwischen 3. bis 8. Fütterungs-
woche im Abstand von 7 Tagen, in der Zeit zwischen
10.- 12. Versuchswoche nach je 14 Tagen und bis zum
Ende der Versuchsreihe anschließend im Abstand von
je 4 Wochen durchgeführt. Diese zeitliche Anordnung
der Gewebsentnahme sollte es ermöglichen, auch akute
Veränderungen zu Beginn der Fütterung erfassen zu
können.

Extraktherstellung

Um die Einzelabweichungen möglichst gering zu halten,
wurden etwa gleichgroße Gewebeproben von 4 verschie-
denen Versuchstieren gemeinsam aufgearbeitet. Sie
wurden im Kühlraum mit in flüssiger Luft vorgekühltem
Mörserbesteck unter ständiger Zugabe von flüssiger
Luft zermörsert. Ein Teil des noch gefrorenen Gewebs-
pulvers wurde zur Extraktherstellung genau ausgewo-
gen.

Etwa 1 g Gewebe wurde mit 10 ml 0,6 n HClO_4 extra-
hiert. Das Gewebe wurde mit dem Ultra-Turrax* zer-
kleinert und das Homogenat in Zelluloseröhrchen in
der Spinco-Zentrifuge** bei 25 000 Umdr./Min. und
einer Temperatur von -4°C während 5 Minuten zentri-

* Ultra-Turrax, Fa. Janke und Kunkel, Staufen im Br.
Typ 18/2

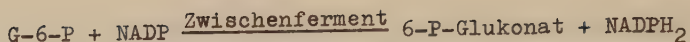
** Beckman Instruments Inc. Fullerton/Calif., USA,
Zweigstelle München 45

fugiert. Der Überstand wurde im Eisbad mit Hilfe eines Magnetrührwerkes und einer Mikrotropfbürette, welche in den Extrakt eintauchte, mit 12 n KOH auf einen pH-Wert von 6,8 - 7,0 gebracht. Die Feststellung dieses Endwertes erfolgte mit Hilfe der Tüpfelmethode und Indikatorpapier der Firma Merck, Darmstadt. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde unter den auf S. 8 beschriebenen Bedingungen in der Spincozentrifuge abzentrifugiert. Der gewogene Überstand war der gebrauchsfertige Extrakt. Er wurde im Eisbad aufbewahrt.

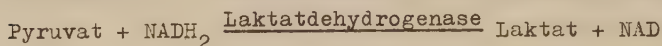
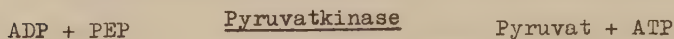
Der optische Test

Zur quantitativen Bestimmung der Metabolite diente der von O. Warburg⁴⁴⁾ und Th. Bücher⁶⁾ ausgearbeitete optische Test. Die Vorzüge dieser Methode liegen neben ihrer Genauigkeit in ihrer raschen Durchführbarkeit, womit ein zeitabhängiger Metabolitzerfall vermieden werden kann, weiterhin in ihrer Substratspezifität und in der Gewebsextrakt sparenden kombinierten Anwendungsmöglichkeit, welche es ermöglicht, mehrere Substrate in einem Testansatz zu bestimmen. Im Prinzip wird bei dieser Methode die Eigenschaft der Nikotinamid-Adenin-dinukleotide, beim Übergang vom oxydierten in den reduzierten Zustand oder umgekehrt ihre Lichtabsorption bei 340 m μ zu ändern, nutzbar gemacht.

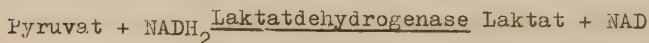
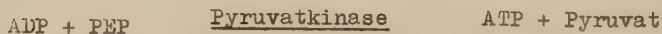
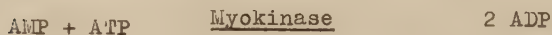
Ein Beispiel für direkten Umsatz mit Nikotinamid-Adenin-dinukleotidphosphat ist folgende Reaktion:



Reagiert eine Substanz nicht direkt mit einem Nikotinamid-Adenin-dinukleotid, so kann man sie durch Vorschalten einer Hilfsreaktion in eine solche überführen, die mit Nikotinamid-Adenin-dinukleotid oder Nikotinamid-Adenin-dinukleotidphosphat reagiert, wie hier am Beispiel der Adenosindiphosphatbestimmung veranschaulicht wird. Siehe dazu Abbildung 1 S. 11.



Weiterhin ist es möglich, mehrere Substrate in einem Testansatz nacheinander zu bestimmen. Nach quantitativer Umsetzung des Substrates A durch sein spezifisches Enzym fügt man das für die Umsetzung des Substrates B erforderliche Enzym hinzu, wodurch im folgenden wieder eine Reduktion oder Oxydation des Nikotinamid-Adenin-dinukleotids ausgelöst wird, welche stöchiometrisch erfaßt wird. Siehe dazu Abbildung 1 S. 11 mit dem Beispiel der Adenosinmonophosphatbestimmung:



Die Durchführung der einzelnen Tests erfolgte am Spektrophotometer DK 2 bei einer Temperatur von 25°C und einer Schichtdicke von 1 - 4 cm. Die Aus-

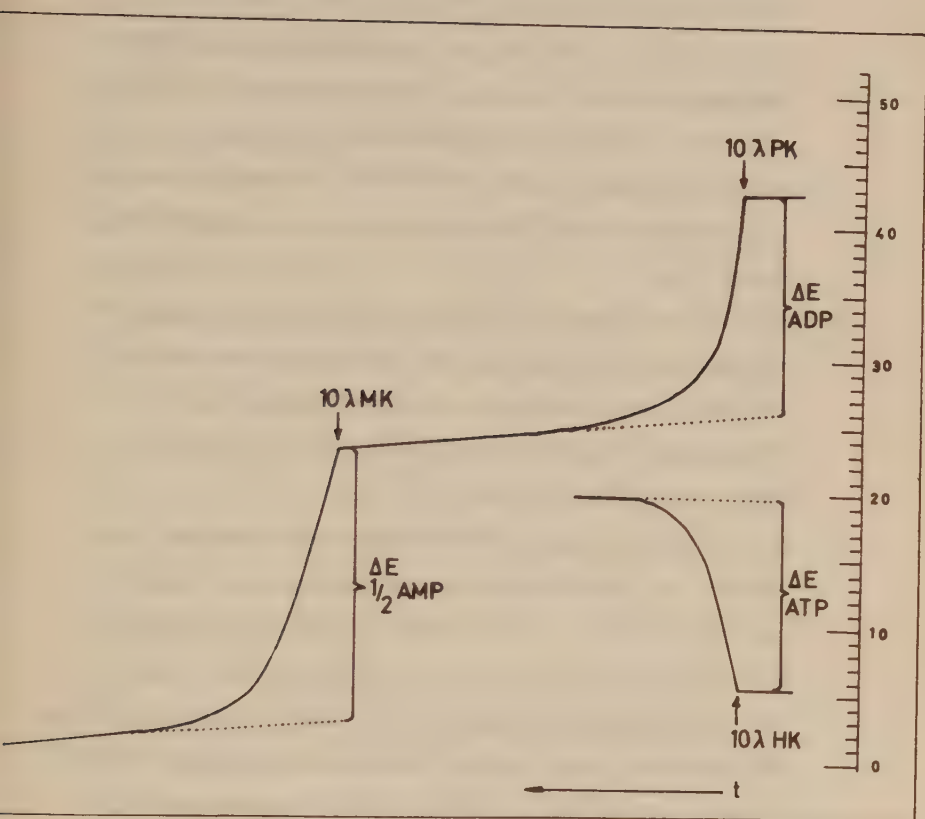


Abbildung 1

Einfache (für Adenosintriphosphat) und kombinierte optische Bestimmung (für Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat) im Leberextrakt mit Extrapolation einer unspezifischen Extinktionsänderung (Schleich)

Beckman DK 2, $d = 1 \text{ cm}$, $t = 25^\circ \text{C}$. Testzusammensetzung siehe methodischer Teil S. 13

wahl der Schichtdicke wurde nach der zu erwartenden Substratkonzentration getroffen. Bei einer Schichtdicke von 4 cm und starker Eigenfärbung des Extraktes war es erforderlich, die Extinktionsdifferenz zwischen Haupt- und Referenzkanal des Spektrophotometers zu kompensieren. Bei einer unspezifischen Extinktionsänderung, durch Enzymzugabe hervorgerufen, wurde diese durch Nachstart mit gleicher Enzymmenge wie im Test bestimmt und bei der Gesamtextinktionsänderung berücksichtigt. Die während eines Tests aufgetretenen konstanten Extinktionsänderungen (Schleiche) wurden durch Extrapolation eliminiert. (Vgl. dazu Abb. 1 S. 11)

Die verwendeten Enzyme und Substrate waren von der Firma C.F. Boehringer und Soehne G.m.b.H. Mannheim geliefert worden. Sie wurden im Kühlraum bei 0° C. und die jeweiligen gebrauchsfertigen Verdünnungen in einem Eisbad aufbewahrt. Das Einbringen der kleinen Enzymmengen in die Quarzküvetten erfolgte mit sehr dünnen, hakenförmig abgebogenen Glasstäbchen, die zugleich als Quirl dienten.

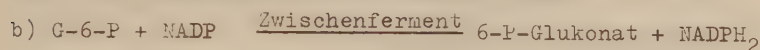
Bei kombinierten Testen richtete sich die Reihenfolge der Enzymzugaben nach der Reinheit der Enzyme und den Reaktionsabläufen.

Die Berechnung der gesuchten Substratgehalte wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes und Umrechnung auf Gramm Frischgewebe durchgeführt. Die Angaben sind in nMol/Gramm Frischgewebe.

Durchführung der einzelnen Bestimmungen:

1.) Adenosintriphosphat:

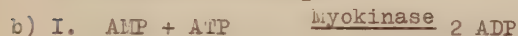
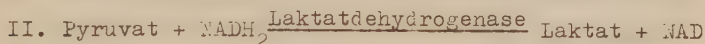
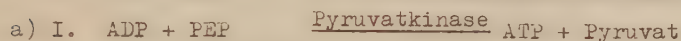
Die Bestimmung erfolgt entsprechend den Gleichungen:



Durchführung entsprechend Lit. 20)21)

2.) Adenosindi- und Adenosinmonophosphat:

Diese beiden Metabolite werden in einem kombinierten Test nach folgenden Reaktionsgleichungen bestimmt:

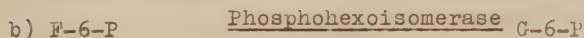
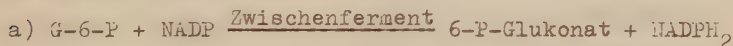


danach entsprechend Gleichung a) I und II.

Durchführung s. Lit. 20)21)

3.) Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat:

Die Erfassung dieser beiden Hexosephosphate erfolgte nach einem kombinierten Test:



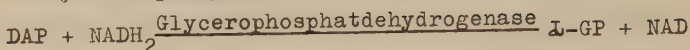
danach Bestimmung nach a)

Testzusammensetzung s. Lit. 20)21)

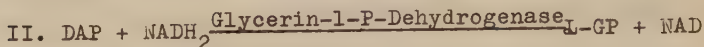
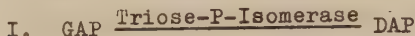
4.) Dioxyacetonphosphat, Glycerinaldehydphosphat, Fruktose-1,6,-diphosphat, Pyruvat und Phospho-enol-pyruvat:

Die Bestimmung dieser 5 Metabolite geschieht in einem Testansatz nach folgenden Gleichungen:

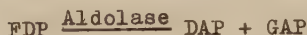
a) Dioxyacetonphosphat:



b) Glycerinaldehydphosphat:

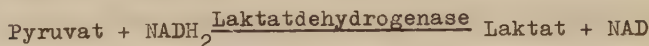


c) Fruktose-1,6-diphosphat

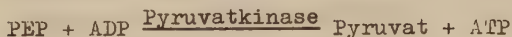


dann wie b.) I. und II.

d) Pyruvat:



e) Phospho-enol-pyruvat:

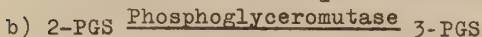
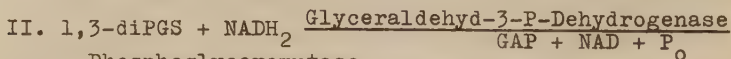
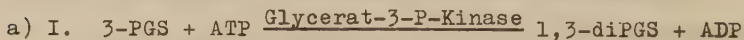


danach wie d)

Testansatz und Durchführung s. Lit.²⁰⁾²¹⁾

5.) 3-Phosphoglycerinsäure und 2-Phosphoglycerinsäure:

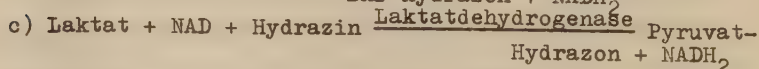
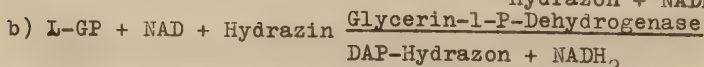
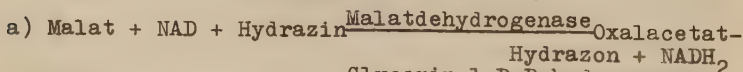
Diese Testkombination erfolgt nach den Reaktionen:



danach wie a) I. und II.

Testzusammensetzung s. Lit.²¹⁾

6.) Malat, L-Glycerophosphat und Laktat:



Testzusammensetzung nach Lit.¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾

7.) Mikrochloridbestimmung:

Die Bestimmung des Chloridgehaltes wurde mit einer Mikromethode nach einer Modifikation der Methode von Lang²⁷⁾ durchgeführt.

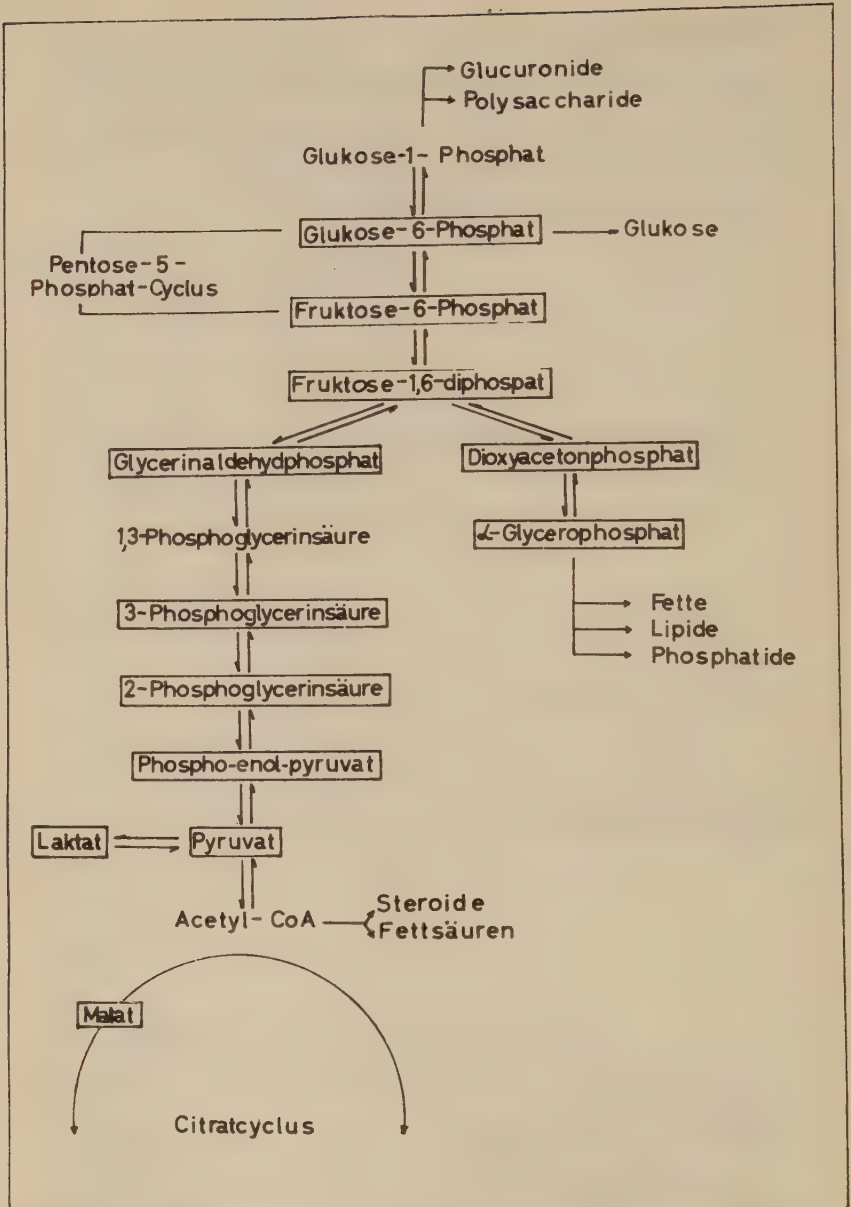


Abbildung 2

Vereinfachtes Schema des glykolytischen Abbaues der Kohlenhydrate und die Beziehungen zum Intermediärstoffwechsel.

ERGEBNISSE

Gemessen wurden die folgenden Zwischenstoffkonzentrationen der Glykolyse, deren Bedeutung im Metabolismus aus der Abbildung 2, S. 16 hervorgeht:

Glukose-6-Phosphat als wesentliches Zwischensubstrat für Auf- und Abbaureaktionen, Ausgangssubstrat des Pentose-5-Phosphatcyclus.

Die zur Aldolasereaktion, dem Übergang der C_6 - in die C_3 -Fragmente, gehörenden Substrate Fruktose-1,6-di-phosphat, Glycerinaldehydphosphat und Dioxyacetonphosphat.

Weiterhin die Substrate 3-Phosphoglycerinsäure und 2-Phosphoglycerinsäure sowie Phospho-enol-pyruvat. Für die Nikotinamid-Adenin-dinukleotide abhängigen Reaktionen, von denen als Reaktionspartner Glycerinaldehydphosphat und Dioxyacetonphosphat oben schon erwähnt wurden, noch das Substratpaar Laktat und Pyruvat.

Zusätzlich wurden die Adenosinnukleotide bestimmt: Adenosinmono-, -di- und -triphosphat, deren Summe als Repräsentant der verfügbaren Nukleotidbausteine angesehen werden kann. Die energetische Bilanz kommt in dem Quotienten Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat zum Ausdruck.

Eine Chloridbestimmung wurde durchgeführt, um eine Änderung des extrazellulären Raumes zu erfassen.

Vergleich der Metabolitgehalte in Lebern unbehandelter Kontrolltiere verschiedener Altersgruppen.

Wenn im folgenden vom Metabolitgehalt der Gewebe gesprochen wird, so bleibt seine Verteilung auf die verschiedenen Lösungsräume (compartiments nach Bücher ¹²⁾) unberücksichtigt. Der Anteil des Blutes, von Hohorst ²¹⁾ mit 7,6 % für die Leber unter Normalbedingungen angegeben, sowie der Gehalt der interstitiellen Flüssigkeit, nach Hohorst 21 % ²¹⁾, bleiben ebenfalls unberücksichtigt. Mit Korrektur des "Gewebsgehaltes" auf "Zellulargehalt" würde sich nach Hohorst ²¹⁾ eine Erniedrigung von Laktat und Pyruvat ergeben, da sich beide zu gleichen Konzentrationen intra- und extrazellulär befinden, während die Werte für alle anderen Metabolite erhöht würden, da sie sich vorwiegend nur intrazellulär nachweisen lassen.

Es werden zunächst die Metabolitgehalte der Lebern von normalen, unbehandelten jungen und alten Versuchstieren verglichen. Diese Fragestellung nach einem Altersunterschied ergab sich aus der Dauer der Versuchsdurchführung, die sich über einen Zeitraum von 43 Wochen erstreckte. Dabei war das Gewicht der Versuchstiere von 140 g auf 450 g angestiegen.

Die Einteilung der Kontrollgruppen wurde nach folgenden Gewichtsgrenzen getroffen.

" Junge" Kontrollratten zusammengefaßt zwischen 140 - 250 g, "alte" Kontrolltiere zwischen 350 - 450 g Gewicht.

Die Bezugsgröße für die Metabolitgehalte ist unter derartigen experimentellen Bedingungen stets problematisch. In dieser Arbeit werden die Metabolitgehalte auf Gramm Frischgewicht bezogen.

In der Tabelle 1 S. 20 sind die Gehalte der gemessenen Metabolite in den Lebern beider Kontrollgruppen gegenübergestellt. Zum Vergleich sind Daten anderer Autoren ²¹⁾³⁹⁾ in die Tabelle aufgenommen. Die Werte in Klammern geben die Einzelstreuungen wieder. Die Ergebnisse sind ferner nach dem t-Test (p-Werte) statistisch dahin ausgewertet, ob die beiden Versuchsreihen echte, differente Kollektive darstellen.^{1 1)}

Wie die Tabelle 1 S. 20 zeigt, besteht ein solcher Unterschied höchstens für den Gehalt an Glukose-6-Phosphat. Alle übrigen Daten heben sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in den beiden Versuchsreihen nicht deutlich voneinander ab, auch nicht gegenüber den Befunden von Lahrtz,²⁶⁾ der die Nukleotidverteilungsmuster im Lebergewebe junger und alter Ratten verglich.

	Vergleichs- werte an- derer Au- toren (2) 39)	Normaltiere (Ratten)		P
		140 - 250 g n = 20	350 - 450 g n = 18	
Adenosintriphosphat	2807	2742 (± 82)	2547 (± 99)	0,4 - 0,3
Adenosindiphosphat	819	360 (± 35)	694 (± 47)	0,02 - 0,01
Adenosinmonophosphat		490 (± 34)	450 (± 25)	0,3 - 0,2
Σ Adennukleotide		4092 (± 62)	6391 (± 144)	0,05 - 0,10
Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat	3,5	3,19 (± 0,26)	3,68 (± 0,37)	0,5 - 0,4
Laktat / Pyruvat	11,5	14,5 (± 0,7)	12,0 (± 0,8)	0,5 - 0,4
L-Glycerophosphat / Dioxyacetonphosphat	7,2	7,3 (± 2,6)	10,0 (± 2,5)	0,05 - 0,10
Glukose-6-Phosphat	370	369 (± 22)	487 (± 29)	< 0,001
Fruktose-6-Phosphat	112	92 (± 20)	134 (± 12)	0,9 - 0,8
Fruktose-1,6-diphosphat	21	22 (± 3,1)	26 (± 5)	0,5 - 0,4
Dioxyacetonphosphat	36	39 (± 1,8)	34 (± 1)	0,05 - 0,10
L-Glycerophosphat	251	287 (± 29)	340 (± 78)	0,05 - 0,10
Glycerinaldehydphosphat		4 (± 0,9)	6 (± 1,2)	
3-Phosphoglycerinsäure	380	370 (± 31)	369 (± 34)	0,2 - 0,1
2-Phosphoglycerinsäure		40 (± 11)	69 (± 9,8)	0,05 - 0,02
Phospho-enol-pyruvat	117	144 (± 5,7)	86 (± 7)	0,7 - 0,6
Pyruvat	154	195 (± 11,2)	144 (± 14)	0,05 - 0,1
Laktat	1540	2830 (± 81)	1730 (± 79)	0,6 - 0,5
Malat	443	390 (± 48)	483 (± 58)	0,6 - 0,5
Chlorid		410 (± 0,38)	417 (± 62)	0,08 - 0,07

Tabelle 1

Gehalte und Quotienten von Substraten des energieliefernden Stoffwechsels in Lebern unbehandelter, männlicher Ratten verschiedenen Alters. (Altersgruppen nach Gewicht zusammengefaßt. Angaben in nMol/g Frischgewicht. Werte in Klammern = s = Standard-Abweichungen)

Metabolitgehalte in Lebern von Ratten während der
Behandlung mit Thioacetamid.

a) Makroskopischer Befund:

10.-21. Fütterungstag: Etwa ab 12. Fütterungstag mit Thioacetamid wiesen die Versuchstiere vorübergehend einen schlechten Allgemeinzustand auf: das Fell zeigte bei verschiedenen Tieren Gelbfärbung und struppige Beschaffenheit. Die Bewegungen der Tiere und ihre Reaktionen auf Umweltreize waren verlangsamt. Eine erste makroskopische Veränderung an den Lebern war bei der Entnahme am 19. Fütterungstag zu beobachten: Die Lebern waren vergrößert, bei glatter Oberfläche war eine makroskopisch sichtbare Lappchenzeichnung sowie eine auffallende Gefäßzeichnung an den Leberrändern und eine hell- bis gelbrote Farbe deutlich.

4.-11. und 15.-24. Fütterungswoche: Nach Weiterverfütterung des Thioacetamids normalisierte sich der Allgemeinzustand der Tiere wieder, sie zeigten eine gute Gewichtszunahme. Wenn man von einigen Fettlebern bei allgemeinem Fettansatz absieht, wurden in diesem Zeitabschnitt bis auf eine Ausnahme keine Leberveränderungen beobachtet. Bei einem Versuchstier war in der 8. Woche die Leber atrophisch, von mittelderber Konsistenz bei einer feinkörnigen bis granulierten Oberfläche und dunkelroter Organfarbe.

27.-31. Fütterungswoche: In diesem Zeitabschnitt waren von 16 der untersuchten Lebern nur noch 7 von unauffälliger Organbeschaffenheit. 7 Lebern waren vergrößert, konsistenzvermehrt, ihre Oberfläche gleichmäßig feingranulär verändert, die Farbe rot-grau bis rot-gelb. Eine Leber war stark vergrößert, die Oberfläche grobhöckrig und unregelmäßig, ihre Farbe wechselnd zwischen hellrot bis grau. Eine Leber war atrophisch, sehr weich in der Konsistenz und sie wies hellrote und dunkelrote sowie graue höckrige Bezirke im Wechsel auf.

43. Fütterungswoche: Von 8 untersuchten Lebern waren nur noch 3 makroskopisch unverändert. Die übrigen 5 waren vergrößert, konsistenzvermehrt und hatten eine feinhöckrige Oberfläche.

b) Metabolitgehalte:

Die Abbildungen 3 S. 23 und 4 S. 24 geben in graphischer Darstellung einen raschen Überblick über die Veränderungen im Metabolitmuster unter der Behandlung mit Thioacetamid. Ein erster Blick auf die Abbildung 3 S. 23, welche neben den Adenin-nukleotiden die Quotienten Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat, Laktat/Pyruvat und Δ -Glycerophosphat/Dioxyacetonphosphat zusammenfaßt, zeigt bereits, daß keine kontinuierliche Progredienz der Veränderungen im Verlauf der Behandlung eingetreten ist. Es scheint eher eine gewisse Stabilität auf verändertem metabolischem Status eingetreten zu

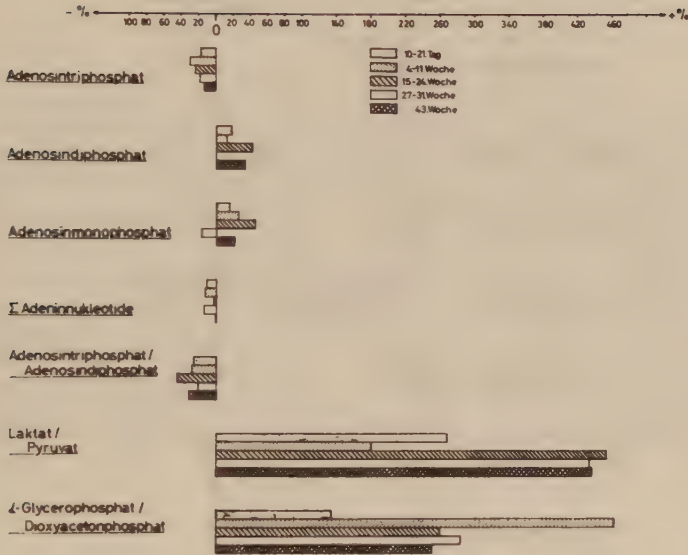


Abbildung 3

Graphische Darstellung der prozentualen Abweichungen der Quotienten Laktat/Pyruvat, Δ-Glycerophosphat/Di-oxyacetonphosphat und des Energiequotienten Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat in der Rattenleber im Verlauf einer mehrmonatigen Thioacetamidbehandlung. (Die Daten repräsentieren innerhalb der verschiedenen Versuchszeiten Mittelwerte aus mind. 10 - 24 Tieren. Zeitabschnitte siehe Zeichenerklärung.)

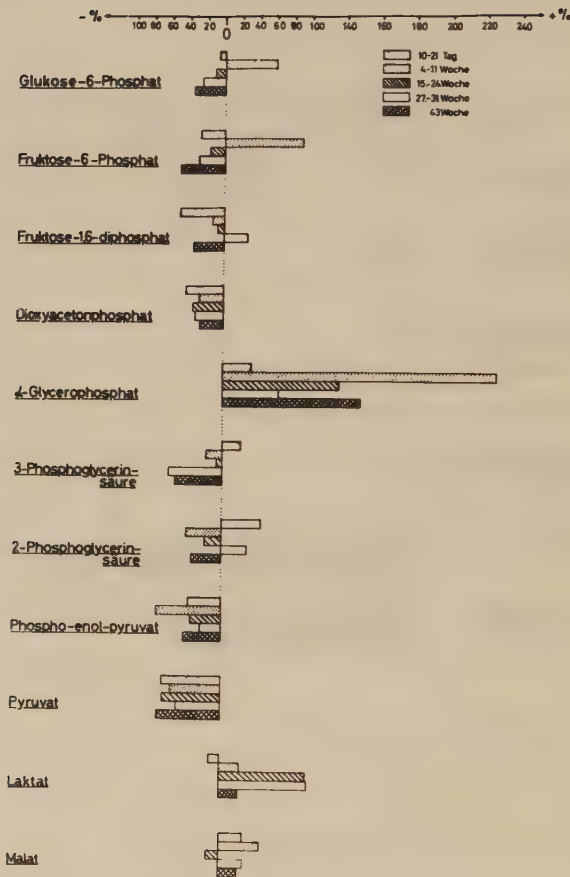


Abbildung 4

Graphische Darstellung der prozentualen Abweichungen wesentlicher Substratgehalte in Rattenlebern unter Thioacetamid. (Mittelwerte von mind. 10 - 24 Tieren innerhalb der einzelnen Versuchsabschnitte, siehe Zeichenerklärung.)

	Kontrolltiere		10.-21. Tag		4.-11. Woche		15.-24. Woche		27.-31. Woche		43. Woche	
	< 250g	> 250g	n	% Abweichung + Kontrolltier	n	% Abweichung + Kontrolltier	n	% Abweichung + Kontrolltier	n	% Abweichung + Kontrolltier	n	% Abweichung + Kontrolltier
Adenosintriphosphat	2742 (± 82)	2547 (± 99)	16	2259 (± 82) -17,7	10	1943 (± 88) -29,2	6	1940 (± 196) -23,0	7	2081 (± 127) -16,2	10	2208 (± 108) -13,4
Adenosindiphosphat	860 (± 35)	694 (± 47)	16	1017 (± 55) +18,4	10	965 (± 64) -12,1	6	985 (± 21) +4,8	7	695 (± 40) 0,0	9	925 (± 63) +3,2
Adenosin- monophosphat	490 (± 34)	450 (± 25)	11	565 (± 81) +15,6	10	615 (± 55) +25,6	6	654 (± 29) +4,2	7	375 (± 29) -15,6	8	545 (± 30) +11,1
Adeninnukleotide	4092 (± 62)	3691 (± 114)	11	3672 (± 106) -10,4	10	3532 (± 79) -13,8	6	3580 (± 104) -13,0	7	3150 (± 163) -14,6	9	3670 (± 93) -0,5
Adenosintriphosphat/ Adenosindiphosphat	319 0,36	368 0,37	10	233 ($\pm 0,08$) -26,8	10	226 ($\pm 0,29$) -28,2	6	196 ($\pm 0,09$) -46,7	6	282 ($\pm 0,15$) -23,3	9	246 ($\pm 0,38$) -3,2
Laktat / Pyruvat	14,0 ($\pm 0,7$)	12,0 ($\pm 0,8$)	8	51,4 ($\pm 9,8$) -26,8	9	39,2 ($\pm 4,9$) -18,0	5	66,6 ($\pm 11,3$) +49,6	6	64,0 ($\pm 13,2$) +43,4	8	64,3 ($\pm 9,9$) +43,6
4-Glycerophosphat/ Dioxyacetylphosphat	73 (± 26)	10,0 (± 28)	11	17,1 (± 10) -13,4	10	410 (± 53) +44,2	6	358 (± 38) +25,8	7	38,3 (± 10) -28,3	10	350 (± 52) -2,0

Tabelle 2

Energetische Bilanz (Adeninnukleotide) und Redox-Quotienten zytoplasmatischer, NAD abhängiger Substrate in der Rattenleber im Verlauf der Behandlung mit Thioacetamid. (Angaben der Gehalte in nmol/g Frischgewicht. Dosierung von Thioacetamid: etwa 1 mg in 24 Stunden mit dem Trinkwasser.)

	Kontrolltiere		10.-21. Tag		4.-11. Woche		15.-24. Woche		27.-31. Woche		43. Woche						
	< 250 g	> 250 g	n	% Abweichung Kontrolltiere	n	% Abweichung Kontrolltiere	n	% Abweichung Kontrolltiere	n	% Abweichung Kontrolltiere	n	% Abweichung Kontrolltiere					
Glukose-6-Phosphat	369 (± 22)	487 (± 29)	13	344 (± 38)	- 7	10	588 (± 27)	- 60	6	431 (± 48)	- 12	6	363 (± 37)	- 25	9	317 (± 31)	- 35
Fructose-6-Phosphat	92 (± 20)	134 (± 32)	13	68 (± 7)	- 27	10	175 (± 9)	- 90	5	112 (± 19)	- 16	7	95 (± 11)	- 28	8	67 (± 9)	- 50
Fructose-1,6-diphosphat	22 (± 3)	26 (± 5)	16	11 (± 1)	- 50	10	19 (± 2)	- 14	6	24 (± 4)	- 8	7	33 (± 4)	- 27	10	17 (± 3)	- 35
Dioxyacetonphosphat	39 (± 3)	34 (± 3)	18	22 (± 3)	- 43	10	28 (± 3)	- 28	6	22 (± 2)	- 35	7	23 (± 3)	- 32	9	25 (± 2)	- 26
ΔGlycerophosphat	287 (± 29)	340 (± 36)	15	382 (± 27)	- 33	10	1013 (± 70)	- 753	6	796 (± 63)	- 134	7	558 (± 77)	- 64	10	876 (± 88)	- 158
Glycerinaldehydphosphat	4 (± 1)	6 (± 1)				10	5 (± 1)			6	8 (± 1)	- 33	10	7 (± 1)		17	
3-Phosphoglycerinsäure	370 (± 31)	369 (± 34)	14	452 (± 37)	- 22	9	304 (± 28)	- 18	5	348 (± 22)	- 6	4	146 (± 17)	- 61	7	172 (± 20)	- 53
2-Phosphoglycerinsäure	40 (± 11)	69 (± 10)	12	58 (± 3)	- 45	9	24 (± 3)	- 40	3	55 (± 17)	- 20	1	89 (± 28)	- 28	6	46 (± 8)	- 33
Phospho-enol-pyruvat	144 (± 5)	86 (± 7)	10	90 (± 9)	- 38	10	38 (± 4)	- 73	6	57 (± 6)	- 34	4	66 (± 9)	- 23	10	51 (± 5)	- 42
Pyruvat	195 (± 11)	144 (± 14)	20	65 (± 8)	- 67	10	84 (± 8)	- 57	6	49 (± 10)	- 66	5	72 (± 2)	- 50	10	40 (± 6)	- 72
Laktat	2830 (± 85)	1730 (± 79)	8	2465 (± 278)	- 13	10	3471 (± 183)	- 23	6	3426 (± 272)	- 98	7	3465 (± 389)	- 100	9	2095 (± 184)	- 21
Malat	390 (± 48)	483 (± 58)	11	486 (± 3)	- 27	10	568 (± 32)	- 46	6	414 (± 23)	- 34	7	353 (± 28)	- 27	10	381 (± 25)	- 21
Chlorid	410 (± 28)	417 (± 42)	8	359	- 13										9	380	- 8

Tabelle 3

Substratgehalte des energieliefernden Stoffwechsels in Lebern Thioacetamidbehandelter Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren entsprechender Altersgruppen. (Angaben der Gehalte in nMol/g Frischgewicht. Dosierung von Thioacetamid: 1 mg/Tag mit dem Trinkwasser.)

sein. Besonders auffällig ist die Änderung im Quotienten L-Glycerophosphat/Dioxyacetonphosphat, die, wie die Tabelle 2 S. 25 zeigt, in erster Linie durch Erhöhung des Gehaltes an L-Glycerophosphat bedingt ist. Eine Erhöhung der Hydrierung des Systemes Laktat/Pyruvat ist dagegen sowohl durch Erhöhung im Gehalt an Laktat als auch durch gleichzeitige Erniedrigung im Gehalt an Pyruvat bedingt. Auffällig ist ferner das kontinuierliche Absinken des Gehaltes an 3-Phosphoglycerinsäure ohne gleichsinniges Verhalten im Gehalt an 2-Phosphoglycerinsäure und ein vorübergehender Anstieg von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat während der 4.-11. Woche der Versuchsreihe.

Allgemein kann man sagen: Es ist eine Zunahme im Gehalt der hydrierten Verbindungen (Laktat, L-Glycerophosphat) und Abnahme an oxydierten und energiereichen Verbindungen (Pyruvat, Phospho-enol-pyruvat und Dioxyacetonphosphat) zu beobachten.

Der Quotient Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat - als Ausdruck eines "Energiepotentials" - ist während der gesamten Versuchsreihe gleichbleibend niedrig, aber er unterschreitet kaum einen Grenzwert von 2. Die Summe der Adennukleotide bleibt unverändert und entspricht den Ergebnissen bei den Kontrolltieren.

c) Metabolitveränderungen bei akuter Leberschädigung
(Ischämie):

Als Vergleich zu den beschriebenen Veränderungen im Metabolitgehalt der Leber unter der kontinuierlichen Einwirkung eines Fremdstoffes wie Thioacetamid und dem damit verbundenen kontinuierlichen Umbau des Lebergewebes (Abnahme von Leberparenchym und Zunahme des Bindegewebes) wird eine Schädigung durch akuten Sauerstoffmangel gegenübergestellt. (Abbildung 5 S. 29 und Tabelle 4 S. 31) Tabelle und besser noch die Abbildung sollen an den hier gemessenen Parametern veranschaulichen, welches Ausmaß der Änderungen bereits in einem Zeitraum von nur wenigen Sekunden möglich ist, sowie eine Abschätzung der unter Thioacetamid gefundenen Verschiebungen ermöglichen und zeigen, wie empfindlich viele der gemessenen Quotienten reagieren. Dies wird deutlich am Anstieg des Quotienten Laktat/Pyruvat von 15 auf über 50 oder dem Abfall des Quotienten Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat von 3,5 auf 1,9 in 15 Sekunden. Die viel geringeren Abweichungen im Verlauf der Thioacetamidschädigung beruhen auf der Erfassung eines methodisch bedingten "Mittelwertes". Es werden Kollektive von Zellen erfaßt, die sicher schwerere Schäden als nach 15 Sekunden Ischämie aufweisen, jedoch gemeinsam mit ungeschädigten oder sogar kompensatorisch tätigen Zellen.

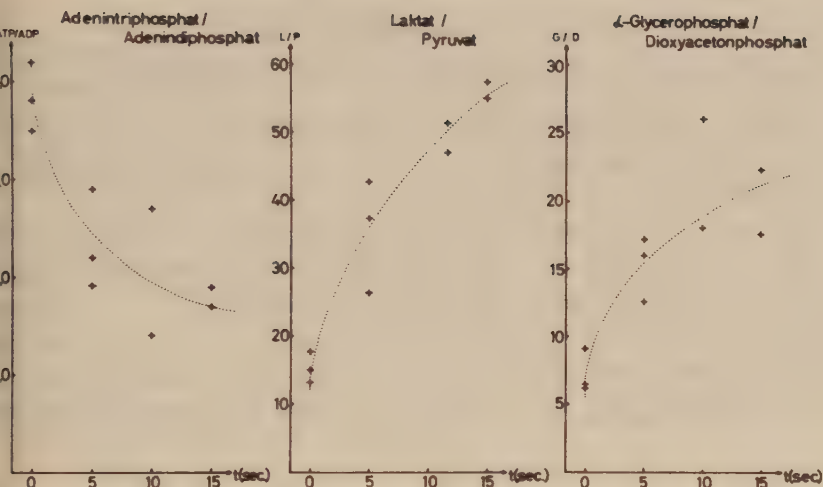


Abbildung 5

Graphische Darstellung zur Tabelle 4 S. 31. (Abszisse Zeit in Sekunden nach Gewebsementnahme, vgl. Text S.28)

d) Verhalten des extrazellulären Raumes:

Die Abnahme des Chloridgehaltes in den Leberextrakten läßt bei den mit Thioacetamid geschädigten Lebern auf eine Verminderung des extrazellulären Raumanteiles schließen. Diese Verminderung tritt sowohl im Frühstadium als auch im Stadium der Leberzirrhose auf (vgl. Tab.3, S.26).

	A			B				C		
	Getrier- stop	5 sec.	10 sec.	Getrier- stop	5 sec.	10 sec.	15 sec.	Getrier- stop	5 sec.	15 sec.
Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat	3,8	2,2	1,4	3,5	2,9	2,7	1,9	4,2	1,9	1,7
Laktat / Pyruvat	15,2	37,3	51,3	17,7	42,8	47,0	55,0	13,1	26,5	57,4
L-Glycerophosphat / Dioxyacetonphosphat	9,2	17,1	26,1	6,4	16,0	18,0	22,6	6,7	12,7	18,3
Adenosintriphosphat	2840	1880	1475	2805	2740	2520	2202	2670	1598	1825
Adenosindiphosphat	747	855	1071	803	945	933	814	644	864	1070
Laktat	2470	4644	5951	477	8303	6298	6775	2850	3640	5800
Pyruvat	162	124	116	236	194	134	125	217	137	101
L-Glycerophosphat	298	820	731	574	720	777	882	232	241	495
Dioxyacetonphosphat	32	33	28	89	45	43	39	35	19	27

Tabelle 4

Nachweis der raschen Veränderungen im System Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat und der Redox Quotienten Laktat/Pyruvat und L-Glycerophosphat/Dioxyacetonphosphat im Verlauf akuter Anoxie. (Zeitangabe in Sekunden nach Gewebseentnahme, Gehalte in nmol/g Frischgewicht)

DISKUSSION

Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß während der mit Thioacetamid gesetzten Leberschädigung bis zur Entstehung einer Zirrhose kaum einschneidende Veränderungen im Metabolismus stattgefunden haben. Dies betrifft den untersuchten Zwischenstoffwechsel des Glukoseabbaues und das Verhältnis der Adenosinnukleotide sowie deren Summe. Während die histologischen Veränderungen eindeutig progredient waren, hielten sich die metabolischen Veränderungen auf einem kaum vom Normalwert abweichenden Niveau.

Man hat nun zu fragen, welche Wirkung auf den Stoffwechsel dem Thioacetamid zuzuschreiben ist. Diese wäre von einem veränderten metabolischen Status bei einer zirrhotisch umgebauten Leber zu trennen. Die Klärung dieser Frage könnte, wenn auch mit Vorbehalten, zur Anschauung über den Pathomechanismus der Zirrhoseentstehung beitragen.

Die bisherigen Ergebnisse über den möglichen Angriffspunkt des Thioacetamids veranschaulicht man am ehesten an den bisher beobachteten histologischen Veränderungen. Es werden diskutiert: Effekte an der Zellmembran und den Mitochondrien, am Zellkern und dem Nukleolus verbunden mit Beeinflussung der Proteinsynthese und schließlich am endoplasmatischen Retikulum verbunden mit

einem gestörten Kohlenhydratstoffwechsel.

Nach Gallagher und Mitarbeitern¹⁵⁾ beruht die Thioacetamidwirkung auf einem Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran für Ca^{++} -Ionen, was die Autoren aus einer Anreicherung von Ca^{++} -Ionen in der mit Thioacetamid geschädigten Leber ableiten. Durch Gaben von Antihistaminika konnten sie diese Anreicherung deutlich verhindern. Es ist bisher nicht bekannt, ob die Ausbildung eines histologisch faßbaren Leberschadens, hervorgerufen durch Thioacetamid, durch die gleichzeitige Gabe von Antihistaminika verhindert werden kann. In hohen Konzentrationen entkoppeln Ca^{++} -Ionen die oxydative Phosphorylierung vollständig,⁸⁾ 28) 32) bringen die Mitochondrien zum Schwellen²⁹⁾ und stimulieren die Fettsäurebildung, während sie in niederen Konzentrationen die Respiration und die oxydative Phosphorylierung anregen.³⁴⁾ Weiterhin stellte Judah²²⁾ bei in vitro-Versuchen eine beschleunigte Inaktivierung der Malatdehydrogenase unter Thioacetamidwirkung fest, wenn er die Lösung anstelle mit 2×10^{-3} mit 3×10^{-3} Molen Ca^{++} -Ionen enthaltenden Puffer versetzt hatte. Dieser Effekt wurde ebenfalls durch Antihistaminika verhindert.

Auch Wachstein und Mitarbeiter⁴²⁾ fanden bei histochemischen Untersuchungen an der Thioacetamidgeschädigten Rattenleber eine frühe Schädigung der Membran, erkennbar an der Verminderung der kanalikulären ATPase-Aktivität, die bereits 5 Stunden nach Thioacet-

amid-Applikation auftrat. Etwas später setzten eine Verminderung der 5-Nukleosidase-Aktivität sowie ein Anstieg der unspezifischen alkalischen Phosphatase ein. 8 Stunden nach Thioacetamidvergiftung wurde eine Ca^{++} -Ionen Zunahme in unmittelbarer Nachbarschaft der Mitochondrien deutlich. Die mitochondriale Aktivität, gemessen an der NAD-Diaphorase, Succinodehydrogenase und ATP-ase wurde erst nach den oben angeführten histochemischen Veränderungen deutlich.

Nach diesen Ausführungen über die Thioacetamidwirkung an der Zellmembran mit einer Ca^{++} -Ionen Anreicherung, wäre eine Erniedrigung des Adenosintriphosphatgehaltes denkbar. Adenosintriphosphat und der Quotient Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat werden zwar während der Dauer der Thioacetamidbehandlung gleichbleibend vermindert gefunden. Der Quotient unterschreitet jedoch kaum einen Grenzwert von 2.

(Vergleiche dazu die Tab.2 S. 25) Die Summe der Adenin-nukleotide gegenüber den Kontrollwerten war unverändert geblieben.

Wie aus den Ergebnissen des Arbeitskreises von Th. Bücher hervorgeht, ist anzunehmen, daß die Enzyme der Embden-Meyerhof-Kette nahe der Zellmembran gelegen sind. Bei einer Schädigung der Zellmembran durch Thioacetamidwirkung wäre eine Änderung der Zwischenstoffkonzentration der Glykolyse denkbar. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß diese möglichen Änderungen durch solche überlagert werden können,

die durch den histologisch beschriebenen Glykogenschwund ihren Ausdruck finden. Nach Beobachtung von Thoenes und Mitarbeiter⁴⁰⁾ sistiert dieser Glykogenschwund nach chronischen Vergiftungen erst nach etwa 8 - 12 Wochen.

Es fand sich zwischen 4.-11. Fütterungswoche mit Thioacetamid ein Anstieg von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat. Wäre dieser allein durch Glykogenabbau bedingt, wäre er früher zu beobachten gewesen. Andererseits könnte dieser Anstieg durch einen erhöhten Umsatz der Glukose über den Pentose-5-Phosphatzzyklus Erklärung finden, wie auf S.37 ausgeführt wird.

Für eine vermehrte Fettsynthese kann der Anstieg des L-Glycerophosphates sprechen. Diese Annahme würde auch mit den Befunden der Histologie und den eigenen Beobachtungen einer zwischenzeitlichen Leberverfettung übereinstimmen. Ob diese Verfettung allerdings einer Ca^{++} -Ionen Wirkung unter Thioacetamid zuzuschreiben ist, muß im Zusammenhang mit den angeführten nur geringen metabolischen Veränderungen bezweifelt werden.

Entgegen den Beobachtungen von Wachstein und Mitarbeiter⁴²⁾ fanden Thoenes und Bannasch⁴⁰⁾ wohl Veränderungen im zytoplasmatischen Raum ohne gleichzeitige Veränderung an den Mitochondrien. Dies könnte zu einer Erklärung des Anstieges der zytoplasmatisch gelegenen hydrierten Verbindungen Laktat

und L-Glycerophosphat ohne gleichzeitigen Anstieg des Malats beitragen. Da es sich bei den gemessenen Werten um Fließgleichgewichte handelt, kann Zunahme der hydrierten Verbindung sowohl vermehrten Zufluß als auch verminderten Abfluß bedeuten. Ein Anstieg des L-Glycerophosphates kann allein durch vermehrte Fettsynthese bedingt sein.

Eine weitere histologische Beobachtung war, daß es unter Thioacetamid-Fütterung zur Kern- und Nukleolusvergrößerung, dem sogenannten Nukleolusphänomen kommt. Schon R. Kleinfeld²⁴⁾ und R. Kleinfeld und v. Haam²⁵⁾ wiesen bereits auf die stark vermehrte Synthese der Ribonukleinsäure im Zellkern nach Thioacetamidverfütterung hin und Becker³⁾ vermutete darin den Angriffspunkt des Thioacetamids. Weitere Autoren wiesen inzwischen auf die typische anregende Wirkung des Thioacetamids auf die nukleäre Ribonukleinsäuresynthese hin.^{1) 33) 27)} Während der Anschwellung des Nukleolus unter Zunahme seines Ribonukleinsäuregehaltes wird das Zytoplasma nahezu frei von basophiler Substanz. Becker und Mitarbeiter⁴⁾ vermuten daher eine Nukleolussperre. Der Nukleolus kann die basophile Substanz nicht in das Zytoplasma ausschleusen.

Rather und Mitarbeiter³³⁾ und Becker und Mitarbeiter⁴⁾ stellten übereinstimmend fest, daß die Zellveränderungen, insbesondere das Nukleolusphänomen auch nach längerer Thioacetamidgabe wieder verschwinden, sobald

man das Präparat absetzte. Sachs und Mitarbeiter,³⁶⁾ Gupta¹⁸⁾ und Rüttner und Mitarbeiter³⁵⁾ sowie Becker und Mitarbeiter⁴⁾ beobachteten nach mehrmonatiger Fütterung mit Thioacetamid, daß die Zellveränderungen, insbesondere das Nukleolusphänomen auch trotz Weiterverfütterung des Pharmakons wieder verschwinden. Sie sehen darin eine Gewöhnung der neuregenerierten Leberzellen an das Thioacetamid im Sinne einer Fermentadaption. Stöcker³⁸⁾ schloß aus den gleichen Beobachtungen auf einen Materialmangel im Nukleolus bei verminderter Protein- und Ribonukleinsäuresynthese im Karyoplasma. Mit autoradiographischer Methode konnte er nachweisen, daß es sich bei dem Nukleolusphänomen nur im ersten Stadium um eine funktionelle Kernschwellung mit vermehrter Syntheseleistung handelt, während sich nach längerer Thioacetamidgabe eine pathologische Kernschwellung mit geringerer Syntheseleistung einstellt.

Vergleicht man diese Ausführungen mit den eigenen Ergebnissen, so fällt eine Zunahme von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat während der 4.-11. Fütterungswoche auf. (Vgl. Abb. 4 S. 24 und Tab. 3 S. 26). Ob die Zunahme und die später eintretende Verminderung dieser Metabolite auf einen vorübergehenden erhöhten Umsatz der Glukose über den Pentose-5-Phosphatzzyklus zurückzuführen ist, kann mit Hilfe der Substratbestimmung allein nicht ausgesagt werden. Eine vermehrte Bereitstellung von Pentose zur Ribonukleinsäuresynthese zu diesem Zeitpunkt wäre aber denkbar.

Thoenes und Bannasch ⁴⁰⁾ fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen des endoplasmatischen Raumes die Trias: Disorganisation und Lichtung des Ergastoplasmas, Schwund der Glykogenzonen und Zunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums. Weiterhin konnten sie eine vermehrte Ansammlung von Fetttropfen in der zytoplasmatischen Matrix, aber keine Veränderung an den Mitochondrien und der Zellmembran beobachten. Dabei konnten die Autoren im Verlaufe der Ergastoplasmaveränderungen 2 Phasen unterscheiden: Disorganisation im ersten Stadium und Lichtung des Ergastoplasmas in einer späteren Phase. Zugleich fanden sie eine deutliche Relation zwischen Ergastoplasmaveränderungen und dem Ausmaß des glatten endoplasmatischen Retikulums und Bildung von Membrankomplexen.

Über die Bedeutung des glatten endoplasmatischen Retikulums gibt es zur Zeit zwei Auffassungen: Einmal sieht man darin eine Vorstufe des Ergastoplasmas. Diese Auffassung stützt sich auf die Beobachtung fließender Übergänge der einen in die andere Form. Nach der anderen Auffassung sieht man einen Zusammenhang zwischen Ausbildung des glatten endoplasmatischen Retikulums und dem Glykogengehalt der Leber. Thoenes und Mitarbeiter ⁴⁰⁾ vermuten daher eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels unter der Thioacetamidwirkung.

Die wesentlichsten Änderungen im Kohlenhydratmetabolismus waren die Anstiege der Quotienten Laktat/

Pyruvat und Δ -Glycerophosphat/Dioxyacetonphosphat. Dabei hatten die hydrierten Reaktionspartner zu und die oxydierten Reaktionspartner abgenommen. Diese Änderungen wurden bereits zu Beginn der Versuchsreihe beobachtet. Demgegenüber zeigen die anderen Metabolite des Zuckerabbaues erstaunlich geringe Abweichungen von den Werten bei altersentsprechenden Normaltieren. (Vgl. dazu Abb.3S.23, Abb.4S.24 und Tab.2 S.25, Tab.3 S.26) Eine Ausnahme bildete die auf S. 37 besprochene vorübergehende Zunahme von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat in dem Zeitabschnitt zwischen 4. und 11. Fütterungswoche.

Die durchgeführten Untersuchungen an den Zwischenstoffkonzentrationen des Kohlenhydratmetabolismus machen deutlich, welche geringen Veränderungen die Leber während der Entstehung einer Zirrhose im Zuckerstoffwechsel erfährt. Weiterhin sinkt das "Energiepotential", erkennbar an dem Quotienten Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat nur um ein geringes ab und erreicht kaum einen Wert unter 2. Die Wirkung des Thioacetamids wurde aber bereits zu Beginn der Versuchsreihe an einer Abnahme des extrazellulären Raumes deutlich. Sie ist durch Bestimmung des Chloridgehaltes ermittelt worden.

Man kann auf Grund der durchgeführten Bestimmungen keine Aussage treffen, ob die Thioacetamidwirkung im Kohlenhydratstoffwechsel zu suchen ist. Im Stadium der deutlichen Leberzirrhose wurden keine wesentlichen Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel beobachtet.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Leber junger und alter Ratten wurden Zwischenstoffkonzentrationen der Glykolyse und die Adenin-nukleotide bestimmt. Ein wesentlicher Unterschied an Substrat- und Adenin-nukleotidkonzentrationen zwischen jungen und alten Vergleichstieren bestand nicht. Die Ergebnisse dienten als Kontrollwerte für Veränderungen unter Thioacetamidbehandlung.
2. Während einer Dauer von 43 Wochen wurden Ratten mit 0,015 % Thioacetamid enthaltendem Trinkwasser gefüttert. Dabei entwickelte sich aus einem frühen entzündlichen Stadium über eine Fibrose eine Leberzirrhose. Während dieser Zeit wurden Substrate der Glykolyse und die Adenin-nukleotide in festgelegten Zeitabständen quantitativ erfasst.
3. Während der langzeitigen Thioacetamidverfütterung kam es frühzeitig zu einer Zunahme der hydrierten zytoplasmatisch gelegenen Verbindungen gegenüber den oxydierten Reaktionspartnern, erkennbar an dem Anstieg der Quotienten Δ -Glycerophosphat/Dioxyacetonphosphatphosphat und Laktat/Pyruvat. Ein gleichsinniger Anstieg von Malat wurde nicht beobachtet. Dagegen wurde ein vorübergehender Anstieg von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat festgestellt.

4. Die Summe der Adeninnukleotide war gleichbleibend und entsprach den Kontrollwerten. Der Quotient Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat war während der gesamten Versuchsdauer erniedrigt, sank aber kaum unter einen Wert von 1,96 : 1 (Kontrollwerte: 3,68 : 1).
5. Obwohl die histologischen und makroskopisch sichtbaren Veränderungen an der Leber unter der chronischen Thioacetamidwirkung fortschritten, schien sich ein Gleichgewicht im Metabolismus eingestellt zu haben.
6. Mit der Bestimmung des Chloridgehaltes in den Leberextrakten konnte eine Abnahme des extrazellulären Raumes während der Entstehung einer Leberzirrhose beobachtet werden.

- 1) Adams, H.R. and H. Busch: Cancer Res. 23, 576 (1963)
- 2) Arnold, H., A. Delbrück und F. Hartmann: D. Arch. f. klin. Medizin, 209, 92 (1963)
- 3) Becker, V.: Ref. Zbl. Path., 100, 362 (1959)
- 4) Becker, V. und W. Walter: Act. hepat.-splen., 3, 129 (1965)
- 5) Börner, P.: Virchows Arch. path. Anat. 333, 269 (1960)
- 6) Bücher, Th.: Biochim. biophys. Acta Amsterdam, 1, 292 (1947)
- 7) Brodehl, J.: Kli. Wo. 39, 956 (1961)
- 8) Carafoli, E., C.S. Rosse and A.L. Lehninger: J.B.C., 239, 3055 (1964)
- 9) Childs, J.F.L. and E.A. Siegler: Science 102, 68 (1945)
- 10) Creutzfeld, W. und K. Beck: Dtsch. med. Wschr., 91, 682 (1966)
- 11) Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tab. (1955)
- 12) Delbrück, A., E. Zebe und Th. Bücher: Bio. Z. 331, 297 (1959)
- 13) Frankö, O.: Acta Anat. 22, 331 (1954)
- 14) Fitzhugh, O.G. and A.A. Nelson: Science 108, 626 (1948)
- 15) Gallagher, C.E., D.N. Gupta, J.D. Judah and K.R. Rees: J. Path. Bact 72, 193 (1956)
- 16) Gros, M.: Gastroenterologia (Basel) 95, 75 (1961)
- 17) Gupta, D.N.: Nature, 175, 257 (1955)
- 18) Gupta, D.N.: J. Path. Bact., 72, 183, 415 (1956)
- 19) Hohorst, H.J.: Diplomarbeit, Marburg (1959)
- 20) Hohorst, H.J.: Dissertation, Marburg (1960)
- 21) Hohorst, H.J., F.A. Kreuz und Th. Bücher: Bio. Z. 332, 18 (1959)
- 22) Judah, J.D.: Nature 185, 390 (1960)
- 23) Kalk, H.: Münch. med. Wschr. 107, 1141 (1965)
- 24) Kleinfeld, R.G.: Cancer Res. 17, 954 (1957)
- 25) Kleinfeld, R.G. and E.v. Haam: Cancer Res. 19, 769 (1959)
- 26) Lahrtz, H.G.: Dissertation, Marburg (1963)

- 27) Lang, K.: Bio. Z. 290, 289 (1937)
- 28) Lehninger, A. L.: J. B. C. 173, 625 (1949)
- 29) Lehninger, A. L.: Physiol. Revs. 42, 467 (1962)
- 30) Michel, F., Z. Krzeminski, V. Himmelmann und A. Kuhlkamp:
Liebigs Ann. Chem. 575, 90 (1951)
- 31) Nygaard, O., L. Eldjan and K. F. Nakken: Cancer Res.
14, 625 (1954)
- 32) Potter, V. R.: J. B. C. 169, 17 (1947)
- 33) Rather, L. J.: Bull. Johns Hopkins Hospital 88, 38 (1951)
- 34) Rossi, C. S. and A. L. Lehninger: J. B. C. 239, 3970 (1964)
- 35) Rüttner, H. J. and R. Rondesz: Pathologica et Micro-
biol. 23, 113 (1960)
- 36) Sachs, H. W., A. Bäumer und G. Menkauf: Acta hepat.-
splenol. 6, 286 (1959)
- 37) Steele, W. J., N. Okamura and H. Busch: J. B. C. 240, 1742
(1965)
- 38) Stöcker, E. und H. W. Altmann: Naturw. 1, 15 (1964)
- 39) Stratmann, D.: Dissertation, Marburg (1964)
- 40) Thoenes, W. und P. Bannasch: Virchows Arch. path. Anat.
335, 556 (1959)
- 41) Ufer, Ch., W. Dölle und G. A. Martini: Der Internist 1, 43
(1966)
- 42) Wachstein, M., E. Meisel and C. Falcon: Am. J. of Pathol.
40, 219 (1962)
- 43) Wollenberger, A., E. G. Krause und B. E. Wahler:
Naturwiss. 45, 294 (1958)
- 44) Warburg, O., Chr. und A. Griese: Bio. Z. 282, 157 (1935)

LEBENS LAUF

Am 4. August 1934 wurde ich als erste Tochter des Bundesbahnoberinspektors Heinrich Frickler und seiner Ehefrau Lotte Frickler in Kassel geboren. Von 1941 bis 1947 besuchte ich die Volksschulen in Kassel-Harleshausen, Kassel-Oberzwehren, Kassel und Klings/Rhön. Mit der Obersekundareife verließ ich 1952 die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel, um in ein Lehrverhältnis zur Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt in Kassel-Harleshausen zu treten. 1955 bestand ich die Lehrabschlußprüfung dort als Laborantin. Seit 1953 besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige in Kassel, wo ich im Herbst 1956 das Zeugnis der Reife erlangte. Anschließend besuchte ich die Fachschule Fresenius in Wiesbaden, wo ich 1958 die Abschlußprüfung als Chem.Techn.Assistentin bestand. Vom Herbst 1958 bis Frühjahr 1959 war ich als Chem.Techn.Assistentin am Physiolog.Chem. Institut der Philipps-Universität in Marburg tätig. Mit dem Sommersemester 1959 nahm ich mein Medizinstudium auf. 1960 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1961 die ärztliche Vorprüfung und am 4.März 1965 das Medizinische Staatsexamen. Mit Ausnahme eines Semesters in Bern/Schweiz, studierte ich in Marburg und habe auch dort die Vorprüfungen und das Staatsexamen abgelegt.

Seit meinem dritten Semester bin ich Mitglied der Studienstiftung des Deutschen Volkes gewesen.

Nach bestandenem Staatsexamen war ich als Medizinalassistentin an folgenden Kliniken der Universität Marburg tätig gewesen: Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Dermatologische Klinik, Medizinische Poliklinik, Chirurgische Klinik und Frauenklinik.

Seit 1960 bin ich verheiratet, wir haben ein Kind.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

an der Philipps-Universität Marburg:

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth,
Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Gross, Hamm, Hartmann,
Hensel, Heuser, Hildebrand, Hornung, Huber, Jakob,
Kessler, Knauff, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Löhr,
Lübbers, Mahr, Martini, Marx, Mattes, v. Mayer-König,
du Mesnil de Rochemont, Müller, Neubauer, Niessing,
Nieth, Oehme, Oksche, Petry, Rodenhäuser, Sauer,
Seidel, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schrappe,
Schwaiger, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Walcher,
Wendt, Würterle, Vogt.

an der Universität in Bern/Schweiz:

Goldmann, Hadorn, Hallauer, Lenggenhager, Mumenthaler,
Neuweiler, Rossi, Saegesser, Schönholzer, Walthard.

Das Thema dieser Arbeit wurde von dem verstorbenen Herrn Professor Dr.med. Hanns Schmitz gestellt. Vor Beginn meines Studiums war ich unter seiner Leitung als Chem..Techn.Assistentin tätig. Für die Unterstützung, die er mir während meiner ersten Studiensemester gewährte, bin ich ihm zu aufrichtigem Dank verpflichtet. Der praktische Teil dieser Arbeit wurde unter seiner Anleitung ausgeführt. Herrn Dozenten Dr. med. Hans Schimassek danke ich für Ermutigung, diese Arbeit fortzusetzen. Unter Leitung von Herrn Professor Dr. rer.nat.P.Karlson wurde sie zu Ende geführt.

